

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

First Hit

Search Forms
End of Result Set
Search Results

☐ **Generate Collection** **Print**

Help

User Searches

Preferences

LI: Entry 1 of 1

File: DWPI

Jan 29, 1998

Logout

DERWENT-ACC-NO: 1998-078056

DERWENT-WEEK: 199808

COPYRIGHT 2004 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Monoclonal antibody specific for CDw109 cell surface protein - used for diagnosis and treatment of leukaemia and carcinoma, also hybridoma DSM ACC 2279 producing it

INVENTOR: BUEHRING, H

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

UNIV TUEBINGEN EBERHARD-KARLS

UYTUN

PRIORITY-DATA: 1996DE-1032755 (August 14, 1996)

Search Selected

Search ALL

Clear

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<input type="checkbox"/> DE 19632755 C1	January 29, 1998		005	C07K016/30

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
DE 19632755C1	August 14, 1996	1996DE-1032755	

INT-CL (IPC): A61 K 39/395; C07 K 16/30; C12 N 5/16; C12 N 5/18; C12 N 15/06; G01 N 33/68

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 19632755C

BASIC-ABSTRACT:

Monoclonal antibody (MAb) that binds specifically to the cell surface protein CDw109 is produced and secreted by hybridoma 40B8, deposited as DSM ACC 2279.

Also claimed is the hybridoma producing the MAb.

USE - MAb are used:

(i) for diagnosis and treatment of tumours, specifically leukaemia and carcinoma (particularly of the lung);

(ii) for detection and/or isolation of leukaemia, carcinoma or haematopoietic stem cells (particularly to separate healthy stem cells from tumour cells in bone marrow

transplantation), activated T lymphocytes and thrombocytes; megakaryocytes; megakaryoblasts and vascular endothelial cells;

(iii) for separation of normal cells from leukaemia and carcinoma cells, and

(iv) for detecting the CDw109 protein in a cell sample (all claimed).

The separated cells of (ii) can be used, e.g. to study tumour development or T-cell activation, also as indicators of inflammation and other diseases.

CDw109 is a glycosylated protein present at high level on tumour cells but at low level on normal cells.

ADVANTAGE - Detection of CDw109 provides an early indication of cancer. MAb react with epitopes different from those recognised by known anti-CDw109 antibodies and these epitopes are specific for the human protein. They also make separation of megakaryocytes and megakaryoblasts from bone marrow and umbilical cord tissue more efficient and simpler.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC CELL SURFACE PROTEIN DIAGNOSE TREAT
LEUKAEMIA CARCINOMA HYBRIDOMA ACC PRODUCE

DERWENT-CLASS: B04 D16 S03

CPI-CODES: B04-F05; B04-G02; B11-C07A5; B12-K04A1; B14-H01A; D05-H09; D05-H11A1;
D05-H15;

EPI-CODES: S03-E14H;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M423 M710 M903 P633 Q233 V600 V611 V754

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1998-026147

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1998-062421



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 196 32 755 C 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 16/30
A 61 K 39/395
C 12 N 5/18
C 12 N 5/18
C 12 N 15/08
G 01 N 33/88

②① Aktenzeichen: 196 32 755.5-41
②② Anmeldetag: 14. 8. 98
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 29. 1. 98

DE 196 32 755 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ **Patentinhaber:**
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Universitätsklinikum, 72076 Tübingen, DE

⑦④ **Vertreter:**
Witte, Weller, Gahlert, Otten & Steil, 70178 Stuttgart

⑦② **Erfinder:**
Bühning, Hans-Jörg, Dr., 72076 Tübingen, DE

⑤⑤ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:**
Sutherland D.R. und Yeo E.L. 1995, »CDw109
clusterreports«, in: Leucocyte Typing V, Schlossman,
S.F. et al. (Hrsg.), S.1787-1789, Oxford University
Press, Oxford U.K.;

⑤④ **Antikörper 40B8**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch an das humane Zelloberflächenprotein CDw1092 bindet. Die Erfindung betrifft ferner Hybridomzellen, die einen derartigen Antikörper erzeugen, sowie ein Verfahren zur Herstellung solcher Hybridomzellen.

DE 196 32 755 C 1

Die Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch an das Zelloberflächenprotein CDw109 bindet.

Das CDw109-Protein ist ein biochemisch noch wenig charakterisiertes Protein, das aus den Veröffentlichungen Sutherland, D.R. und Yeo, E.L. (1995), "CDw109 Cluster Report", in: Leukocyte Typing V, Schlossmann, S. et al. (Herausgeber), Seiten 1767—1769, Oxford University Press, Oxford, U.K.; sowie Sutherland, D.R. et al. (1991): "Identification of a Cell-Surface Antigen Associated with Activated T Lymphoblasts and Activated Platelets", Blood, Band 77 Nr. 1, Seiten 84—93, bekannt ist.

Das CDw109-Protein ist ein sehr stark glycosyliertes Zelloberflächenprotein mit einer Molmasse von 170 kDa, das über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellmembran verankert ist. Proteine, die über diese spezielle Zuckerstruktur in der Zellmembran verankert sind, zeichnen sich dadurch aus, daß sie weder eine Transmembran — noch eine zytoplasmatische Domäne aufweisen. Da auch kleinere Formen des CDw109-Proteins von 150 bzw. 120 kDa aus zellulärem Material isoliert wurden, wird dieses Protein entweder proteolytisch degradiert, oder es liegt in unterschiedlich modifizierten Formen vor. Möglicherweise enthalten die kleineren CDw109-Varianten geringere Mengen an Kohlenhydrat-Resten.

Liganden des CDw109-Proteins sind nicht bekannt. Das Protein wird auf einigen wenig differenzierten oder undifferenzierten humanen Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert, nämlich auf einer kleinen Subpopulation hämatopoetischer Stammzellen, die nur ca. 10% der CD34-positiven Zellen umfaßt. Außerdem wird es auf Megakaryoblasten und Megakaryozyten exprimiert. Als Megakaryoblasten bezeichnet man die Vorläuferzellen, die zu Megakaryozyten weiter differenzieren. Aktivierter T-Lymphoblasten produzieren das CDw109-Protein, wenn sie mit dem Cytokin IL-2 kultiviert werden.

Auch einige ausdifferenzierte Zellen exprimieren das CDw109-Protein. Es wurde auf Thrombozyten, die mit Thrombin oder Phytohämagglutinin aktiviert wurden, sowie auf vaskulären endothelialen Zellen detektiert, also auf Zellen, die das Innere der Blutgefäßwände auskleiden, wie bspw. Nabelschnurendothelzellen.

Aufgrund dieses Expressionsmusters des CDw109-Antigens wird ihm eine Rolle bei der Zelladhäsion, -aktivierung und -proliferation zugeschrieben.

Darüber hinaus wurde gezeigt, daß das CDw109-Protein auf Tumorzellen exprimiert wird. Es wurde bspw. auf wenig differenzierten Zellen von akuten T-Zell-Leukämien und akuten Prä-B-Zell-Leukämien gefunden, also auf Tumorzellen des hämatopoetischen Systems und Immunsystems. Außerdem wurde das CDw109-Protein auf einer Reihe epithelialer Tumorzelllinien nachgewiesen. Tumoren epithelialen Ursprungs werden auch als Karzinome bezeichnet.

Karzinome und Leukämien sind die häufigsten Tumorarten. So machten im Jahr 1993 in den USA die Karzinome 85% aller neuen Tumorfälle, die Leukämien immerhin 8% aus (Daten von der American Cancer Society, Cancer Facts and Figures, 1993).

Während die Expression des CDw109-Proteins auf normalen hämatopoetischen Stammzellen sehr gering ist, wird es auf leukämischen Blasten, also entarteten Zellen, die in einem wenig differenzierten Stadium vor-

liegen, häufig überexprimiert.

Aus der Tatsache, daß das CDw109-Protein in großen Mengen auf Tumorzellen, jedoch in wesentlich geringeren Mengen auf den genannten normalen Körperzellen exprimiert wird, ergibt sich, daß das CDw109-Protein auch ein Marker für Leukämie- und Karzinomzellen und damit ein Tumormarker ist.

Ein solcher Tumormarker ist ein wertvolles Hilfsmittel, mit dessen Hilfe eine frühzeitige Diagnose von entarteten Zellen möglich ist. Nur bei einer frühzeitigen Diagnose der stark invasiven Leukämie- oder Karzinomzellen ist eine Heilungschance gegeben. Darüber hinaus kann ein Tumormarker Ansatzpunkt für die therapeutische Behandlung von Tumorerkrankungen sein.

Um einen Tumormarker wie das CDw109-Protein bei der Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen einsetzen zu können, ist als Vermittler ein Antikörper notwendig. Ein solcher Antikörper kann sowohl mit einfachen Nachweisreagenzien wie Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiven Stoffen als auch mit speziellen therapeutisch wirksamen Reagenzien gekoppelt sein.

Da polyklonale Antikörper nur begrenzt verfügbar und nicht identisch reproduzierbar sind, sollte der Antikörper monoklonal sein.

Aus der Veröffentlichung von Sutherland und Yeo (siehe Zitat auf Seite 1) sind bereits eine Reihe von monoklonalen Antikörpern bekannt, die gegen das CDw109-Protein gerichtet sind.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen weiteren monoklonalen Antikörper mit anderer Epitopspezifität bereitzustellen, der spezifisch an das humane CDw109-Protein bindet.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung eines monoklonalen Antikörpers gelöst, der von Hybridomzellen produziert und freigesetzt wird, die unter der Nummer DSM ACC 2279 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, nach den Vorschriften des Budapester Vertrags am 17. Juli 1996 hinterlegt worden sind. Der Antikörper ist mit der Bezeichnung 40B8 benannt. Er weist den Isotyp IgG 1 auf und besitzt die Fähigkeit, spezifisch an das Zelloberflächenprotein CDw109 zu binden.

Mit dem erfindungsgemäßen Antikörper wurde ein weiterer monoklonaler Antikörper bereitgestellt, der standardisiert reproduzierbar ist und somit potentiell unbegrenzt hergestellt werden kann, und der spezifisch an das CDw109-Protein bindet.

In von dem Erfinder der vorliegenden Anmeldung durchgeführten Versuchsreihen wurde festgestellt, daß der Antikörper 40B8 mit folgenden Tumorzelllinien reagiert:

Lungenkarzinomzellen:

SK-MES, Calu 1, Calu 6, SK-LU1,

Cervix-Karzinomzellen:

HELA,

Erythroblastische/megakaryoblastische Zelllinien:

UT-7, TF-1, M07e, MEG-01, HEL, MOLM-1, KU.812,

Myeloblastische Leukämiezellen:

KG-1a, OCI/AML-4,

T-lymphoblastische Leukämiezellen:

CML-T1,

Prä-B-lymphoblastische Leukämiezellen:

Reh/Km3, Nalm-1.

Der erfindungsgemäße Antikörper ermöglicht eine gezielte Erkennung und Beeinflussung der genannten Zellen sowie weiterer Zellen, die das CDw109-Protein auf ihrer Zelloberfläche tragen. Er stellt damit ein zu den bekannten Antikörpern alternatives Mittel für den

Arzt und Forscher dar, um einerseits solche Zellen nachzuweisen, und zwar sowohl in der Zellkultur als auch im Patientenorganismus, und um andererseits diese Zellen ggf. zu manipulieren, entweder durch den Antikörper selbst oder durch daran gekoppelte, spezifische Reagenzien.

Die Erfindung betrifft ferner die Hybridomzellen, die unter der Nummer DSM ACC 2279 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt sind und den Antikörper mit der Bezeichnung 40B8 produzieren.

Die erfindungsgemäßen Hybridomzellen können durch ein Verfahren zur Herstellung von Hybridomzellen erzeugt werden, das die im Stand der Technik grundsätzlich geläufigen Schritte umfaßt, wie sie bspw. von Bühring et al. (1991) in Hybridoma, Band 10, Nr. 1, S. 77–78 beschrieben wurden:

1. Immunisierung oder Sensibilisierung eines Tieres, vorzugsweise einer Maus vom Balb/c-Stamm, mit dem Antigen bzw. Immunogen;
2. Gewinnung der antikörperproduzierenden Zellen, vorzugsweise der Milzlymphozyten dieses Tieres;
3. Fusionierung dieser antikörperproduzierenden Zellen mit einer stabilen, immortalisierten Zelllinie, vorzugsweise einer Myelomzelllinie, zu Hybridomzellen; und
4. Vereinzelung und Vermehrung (Klonierung) solcher Hybridomzellen, die einen Antikörper sezernieren, der an das Antigen bindet.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Hybridomzellen wird das Tier mit Zellen der myeloischen Leukämie-Zelllinie KG-1a, die von der American Type Culture Collection (ATCC, Nr. CCL 246.1) erhalten wurde, immunisiert.

Diese Zelllinie zeigt eine starke Expression von CDw109. Außerdem ist die Zelllinie KG-1a eine undifferenzierte myeloische Leukämiezelllinie, die z. B. den Stammzellmarker CD34 exprimiert. Dadurch war es möglich, einen Antikörper gegen ein für Leukämien typisches Antigen herzustellen.

Wenn Hybridomzellen gesucht werden, die Antikörper produzieren, welche gegen Oberflächenproteine der Zelllinie KG-1a gerichtet sind, ist es bei der Vereinzelung der Hybridomzellen vorteilhaft, wenn nur solche Hybridomzellen auf die Spezifität der von ihnen produzierten Antikörper mit KG-1a-Zellen getestet werden, bei denen zuvor nachgewiesen wurde, daß diese Antikörper eine schwache oder eine negative Reaktion mit peripheren Blutzellen zeigen.

Wenn nach Hybridomzellen gesucht wird, die Antikörper produzieren, die gegen einen potentiellen Leukämie-Tumormarker gerichtet sind, so ist es außerdem vorteilhaft, wenn der von den Hybridomzellen sezernierte Antikörper nur Leukämiezellen erkennt.

Durch dieses Screeningschema werden solche Hybridomzellen ausgesucht, die Antikörper produzieren, die gegen Antigene gerichtet sind, welche nur auf der myeloischen Leukämie-Zelllinie KG-1a, nicht aber auf peripheren Blutzellen oder normalen Knochenmarkszellen exprimiert werden. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, eine Hybridomzellen zu selektionieren, welche einen Tumormarker-spezifischen Antikörper herstellt.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers mit der Bezeichnung 40B8, wie

er von den unter der Nummer DSM ACC 2279 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegten Hybridomzellen produziert und freigesetzt wird, zur Diagnose von malignen Blutzellen, d. h. von Blutkrebs, insbesondere von Leukämien, sowie von epithelialen Tumoren, insbesondere Lungenkarzinomen.

Wie oben aufgeführt, wurde festgestellt, daß der Antikörper 40B8 eine Reihe von epithelialen Tumorzelllinien erkennt, vor allem Lungenkarzinomzelllinien. Hier wird also ausgenutzt, daß die Tumorzellen sich von den gesunden Körperzellen durch die Expressionsdichte des CDw109-Proteins in der Zellmembran unterscheiden. Ein erfindungsgemäßer Antikörper, der mit einem Nachweismittel, beispielsweise einem radioaktiven Marker gekoppelt ist, bindet dieses Nachweismittel indirekt an diese Zellen und ermöglicht damit die direkte Identifizierung dieser Zellen, beispielsweise mit röntgendiagnostischen/szintigraphischen Methoden. Damit ist eine sehr frühe Tumordiagnose unter Umständen sogar in vivo möglich.

Da Karzinome und Leukämien die häufigsten Tumorarten darstellen, könnte ein solches Diagnoseverfahren eine breite Anwendung finden. Eine frühe Diagnose ist besonders bei Leukämien essentiell, da hier häufig Heilungschancen durch die Chemotherapie bestehen.

Da der erfindungsgemäße Antikörper an das CDw109-Protein und damit an ein Protein bindet, das auf Leukämiezellen und Zellen epithelialer Tumoren wie bspw. Lungenkarzinomzellen hochexprimiert wird, auf normalen Zellen jedoch nur gering exprimiert wird und daher als Tumormarker bezeichnet werden kann, bietet er einen direkten Angriffspunkt für eine Manipulation der Krebszellen.

Die Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers 40B8, wie er von den unter der Nummer DSM ACC 2279 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, hinterlegten Hybridomzellen produziert und freigesetzt wird, zur therapeutischen Behandlung von malignen Blutzellen oder Karzinomzellen.

Der Antikörper kann mit einem therapeutisch wirksamen Mittel gekoppelt sein und dadurch eine direkte und gezielte Beeinflussung oder gar Eliminierung der Tumorzellen ermöglichen.

Um die therapeutische bzw. die diagnostische Applikation des erfindungsgemäßen Antikörpers zu erleichtern, sollte der Antikörper mit entsprechend geeigneten Hilfssubstanzen in einer pharmazeutischen Zubereitung vermischt sein.

Dabei kann der Antikörper 40B8 mit einem speziellen, gegen die Leukämiezellen und/oder die Karzinomzellen gerichteten Diagnostikum bzw. Therapeutikum gekoppelt sein.

Da das CDw109-Protein außer auf Leukämie- und Karzinomzellen auch auf einer kleinen Subpopulation CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen von 10% sowie auf aktivierten T-Lymphoblasten, aktivierten Thrombozyten, Megakaryoblasten, Megakaryozyten und vaskulären Endothelzellen exprimiert wird, betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Antikörpers zum Nachweis und/oder zur Isolierung der genannten Zellen. Der Antikörper 40B8 kann dazu in ein Verfahren zum Nachweis und/oder zur Isolierung der genannten Zellen eingesetzt werden, das die Schritte umfaßt:

- 1) Inkubation einer Zellsuspension, die die genannten Zellen enthält, mit einem Antikörper, der an das CDw109-Antigen bindet, und
- 2) Abtrennung der den Antikörper bindenden Zellen von den übrigen Zellen.

Durch die mit diesem Verfahren mögliche Isolierung der kleinen Subpopulation an hämatopoetischen Stammzellen, die wie die Tumorzellen das CDw109-Protein exprimiert, werden diese speziellen hämatopoetischen Stammzellen weiterführenden Analysen zugänglich gemacht. Es kann bspw. untersucht werden, ob diese hellen Vorstufen für Tumorzellen darstellen. Damit können möglicherweise neue Erkenntnisse zur Tumorentstehung gesammelt werden.

Bei der mit diesem Isolierverfahren ermöglichten Reinigung aktivierter T-Lymphoblasten und aktivierter Thrombozyten können außerdem Analysen zum Mechanismus der Aktivierung durchgeführt werden. Darüber hinaus können solche aktivierten Zellen auch Indizien für Entzündungsreaktionen und andere Krankheiten sein und somit zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden.

Die Isolierung von Megakaryoblasten und Megakaryozyten sowie von vaskulären Endothelzellen aus Geweben wie Knochenmark oder Nabelschnurgewebe ist schwierig und aufwendig. Die Isolierung mit Hilfe des spezifischen Antikörpers 40B8 stellt eine effiziente und vergleichsweise einfache Methode dar, mit der diese Zellen spezifisch aus Organen oder Geweben abgetrennt werden können.

Die Abtrennung kann mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS), mittels Säulenchromatographie oder durch direkte Immunadhärens erfolgen.

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) werden Zellen, die das CDw109-Protein tragen, mit dem erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper 40B8 gemischt, der zuvor direkt oder indirekt mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelt wurde. Die auf diese Weise fluoreszenzmarkierten Zellen können dann mit bekannten Sortiertechniken nach der jeweiligen Fluoreszenzstrahlung sortiert werden.

Um ein solches Nachweis- bzw. Isolierverfahren schnell und ohne umständliche Vorbereitungen durchführen zu können, sieht die Erfindung einen entsprechenden Kit vor, der den erfindungsgemäßen Antikörper 40B8 enthält.

Da sich viele neoplastische Zellen wie die bereits genannten Leukämie- und Karzinomzellen von normalen, d. h. gesunden Zellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie das CDw109-Protein in großen Mengen auf der Zelloberfläche exprimieren, kann der erfindungsgemäße Antikörper zur Abtrennung normaler Zellen von neoplastischen Leukämie- oder Karzinomzellen verwendet werden. Dazu kann ein Verfahren mit folgenden grundsätzlichen Schritten durchgeführt werden:

- 1) Inkubation einer Mischung von normalen Zellen und neoplastischen Leukämie- bzw. Karzinomzellen mit dem Antikörper 40B8, und
- 2) Abtrennung der normalen Zellen von den neoplastischen Leukämie- bzw. Karzinomzellen anhand der unterschiedlichen Anzahl von CDw109-Molekülen in der Plasmamembran der normalen Zellen einerseits und der neoplastischen Leukämie- bzw. Karzinomzellen andererseits.

Die Abtrennung kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß die Zellen in der Mischung zunächst mit dem erfindungsgemäßen Antikörper markiert werden, dann mit einem gegen den Spenderorganismus des Antikörpers 40B8 gerichteten, biotinylierten Antikörper gekoppelt werden und schließlich durch eine Avidinsäule laufen gelassen werden. Zellen mit einer hohen Anzahl von CDw109-Molekülen werden in der Säule zurückgehalten, während Zellen ohne oder mit wenig CDw109-Protein durch die Säule hindurchlaufen. Alternative Abtrennverfahren sind die direkte Immunadhärenz, die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) und die magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS).

Das Isolierverfahren kann insbesondere bei Knochenmarktransplantationen eingesetzt werden, um gesunde hämatopoetische Stammzellen von gegebenenfalls vorhandenen Tumorzellen abzutrennen und auf diese Weise das zu transplantierende Knochenmark zu reinigen. Vor allem bei Eigentransplantationen (autologen Transplantationen) im Anschluß an eine Chemo- oder Strahlentherapie wird damit die Gefahr einer Reinfektion des Patienten deutlich vermindert.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung des Antikörpers 40B8 zum Nachweis des CDw109-Proteins in einer Zellprobe. Dazu kann ein Verfahren eingesetzt werden, das die grundsätzlichen Schritte umfaßt:

- 1) Inkubation einer Zellprobe mit dem Antikörper 40B8, und
- 2) Erfassung des an das CDw109 gebundenen Antikörpers.

Die Zellprobe kann normale Zellen und/oder Leukämiezellen und/oder Zellen von Karzinomen umfassen. Die Erkennung des gebundenen Antikörpers erfolgt beispielsweise vermittels eines an den Antikörper 40B8 gekoppelten Markers.

Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich, beispielsweise eine Blut- oder Gewebeprobe von einem Patienten mit Verdacht auf Trumorerkrankung auf das Vorhandensein von neoplastischen Leukämiezellen oder Karzinomzellen zu testen.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines konkreten Ausführungsbeispiels näher erläutert.

Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen das Zelloberflächenprotein CDw109

Als Antigen werden Zellen der myeloischen Leukämie-Zelllinie KG-1a (ATCC Nr. CCL 246.1) verwendet.

Acht Wochen alte Balb/c-Mäuse werden zweimal in Intervallen von 10 Tagen intraperitoneal mit 10^7 Zellen der Zelllinie KG-1a immunisiert. Vier Tage vor der Fusion werden 5×10^5 Zellen direkt in die Milz appliziert, um die Immunantwort zu verstärken.

Die Antikörper-Bildung im Mäusorganismus wird dadurch überprüft, daß das Blutserum des betreffenden Tieres in dem dem Fachmann geläufigen ELISA-Test auf Bindungseigenschaften mit dem Antigen untersucht

wird.

Nach ca. 3 Wochen werden die Lymphozyten des erfolgreich immunisierten Tieres gewonnen, indem die Milz herausoperiert und zu einer Zellsuspension zer-

kleinert wird.
Die suspendierten Milzzellen werden in Anwesenheit von Polyethylenglykol mit Myelomzellen des bekannten Stammes SP2/0 fusioniert. Die Fusionskultur wird in Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-(HAT)-haltigem Medium, hier in HAT-RPMI-1640, kultiviert, in dem sich nur Hybridzellen vermehren können, da diese sowohl die Eigenschaft der Myelomzellen zur unbegrenzten Teilungsfähigkeit als auch die Eigenschaft der antikörperproduzierenden Lymphozyten zum Wachstum in HAT-haltigem Medium haben.

Nach der Fusion werden die Zellen in Napfplatten ausplattiert und bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Kulturüberstände werden nach 10–14 Tagen auf der KG-1a Zelllinie im Durchflußzytometer gescreent. In einem zweiten Schritt werden die Überstände auf Reaktivität mit peripheren Blutzellen getestet, da diese keine selektiven Stammzellantigene exprimieren. Überstände, die eine negative oder schwache Reaktion mit peripheren Blutzellen zeigen, werden anschließend auf Reaktivität mit Knochenmarkszellen getestet. Hybridome, die Antikörper mit Spezifität für eine kleine Subpopulation von ca. 1% der Knochenmarkszellen produzieren bzw. Antikörper, die keine Knochenmarkszellen erkennen, werden ausgewählt und nach dem bekannten Grenzverdünnungsverfahren vereinzelt und kultiviert, d. h. kloniert.

Positiv reagierende Hybridomzellkulturen werden weiter kultiviert, die Antikörper angereichert, gereinigt und charakterisiert.

Nach der obigen Screening-Strategie wurde der monoklonale Antikörper 40B8 erhalten. Der Isotyp wurde über PE-konjugierte anti-Isotyp-spezifische Antiseren durch indirekte Immunfluoreszenz zu IgG1 bestimmt.

Die Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Antikörper erfolgte mit den in Fachkreisen allgemein bekannten Methoden.

Der Antikörper 40B8 der von den unter der Nummer DSM ACC 2279 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, hinterlegten Hybridomzellen erzeugt wird, weist die folgenden charakteristischen Merkmale auf:
Immunglobulinklasse: IgG1
spezifische Bindungsaffinität an: CDw109.

Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper, der spezifisch an das Zelloberflächenprotein CDw109 bindet, dadurch gekennzeichnet, daß er von Hybridomzellen produziert und freigesetzt wird, die unter der Nummer DSM ACC 2279 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt sind und die Bezeichnung 40B8 tragen.
2. Hybridomzellen, dadurch gekennzeichnet, daß sie unter der Nummer DSM ACC 2279 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt sind und die Bezeichnung 40B8 tragen.
3. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 zur diagnostischen Behandlung von Tumoren, insbesondere von Leukämien und Karzinomen.

4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper an ein zellulär zielgerichtetes Diagnostikum gekoppelt ist.

5. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 zur therapeutischen Behandlung von Tumoren, insbesondere von Leukämien und Karzinomen.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper mit einer wirksamen Menge eines Therapeutikums gekoppelt ist, das gegen die Leukämiezellen oder Karzinomzellen gerichtet ist.

7. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 zum Nachweis und/oder zur Isolierung von Leukämiezellen, Karzinomzellen, hämatopoetischen Stammzellen, aktivierten T-Lymphoblasten, aktivierten Thrombozyten, Megakaryoblasten, Megakaryozyten oder vaskulären Endothelzellen.

8. Kit zum Nachweis von Leukämiezellen, Karzinomzellen, hämatopoetischen Stammzellen, aktivierten T-Lymphoblasten, aktivierten Thrombozyten, Megakaryoblasten, Megakaryozyten oder vaskulären Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Antikörper nach Anspruch 1 enthält.

9. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 zur Abtrennung normaler Zellen von neoplastischen Leukämie- oder Karzinomzellen.

10. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 zum Nachweis des CDw109-Proteins in einer Zellprobe.

- Leerseite -